

Rec'd PCT/PTO 17 DEC 2004

PCT/JP03/04308 #4

日 本 国 特 許 庁

03.04.03

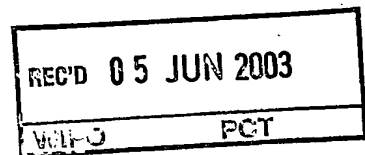
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 6月28日



出 願 番 号
Application Number:

特願2002-191497

[ST.10/C]:

[JP2002-191497]

出 願 人
Applicant(s):

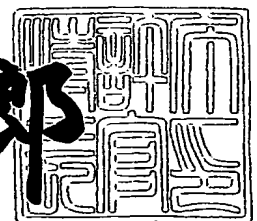
株式会社島津製作所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3035948

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020280

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/68

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 九山 浩樹

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 安藤 英治

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内

 【氏名】 西村 紀

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社 島津製作所

 【電話番号】 075-823-1111

【代理人】

 【識別番号】 100100561

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岡田 正広

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 064002

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規スルフェニル化合物及びそれを含むラベル化試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式：



(式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物。

【請求項2】 前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、請求項1に記載のスルフェニル化合物。

【請求項3】 前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きい、請求項1又は2に記載のスルフェニル化合物。

【請求項4】 前記同位体で標識された構成元素の数が3以上である、請求項1～3のいずれか1項に記載のスルフェニル化合物。

【請求項5】 前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基、又は置換されていても良いアリール基である、請求項1～4のいずれか1項に記載のスルフェニル化合物。

【請求項6】 前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求項5に記載のスルフェニル化合物。

【請求項7】 前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、請求項5に記載のスルフェニル化合物。

【請求項8】 前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、請求項5又は7に記載のスルフェニル化合物。

【請求項 9】 前記脱離基 X がハロゲン原子である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のスルフェニル化合物。

【請求項 10】 2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2, 4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び 2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、請求項 1～5 及び 7～9 のいずれか 1 項に記載のスルフェニル化合物。

【請求項 11】 請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載のスルフェニル化合物を含むラベル化試薬。

【請求項 12】 タンパク質の解析の用途における、請求項 11 に記載のラベル化試薬。

【請求項 13】 前記スルフェニル化合物から選ばれた 1 つの化合物と、前記選ばれた 1 つの化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物とをそれぞれ別個に含む、請求項 11 又は 12 に記載のラベル化試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、例えばタンパク質の解析用途に好適な化合物及びそれを用いたラベル化試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

スルフェニル化合物は、トリプトファン残基のインドール環と反応するため、従来からトリプトファン残基の選択的ラベル化試薬として知られている。一方、昨今のポストゲノムの流れの中で、より高感度のマスペクトルが開発され、マスペクトルを応用するペプチド解析法が種々考案されてきている。これに伴い、新規で有用なラベル化試薬の開発が求められている。マスペクトルを応用するという観点から開発された試薬の 1 つに、I C A T (Isotope Coded Affinity Tag) 試薬が挙げられる。これを用いる方法は、ワシントン大学の Aebersold らにより開発された、タンパク質発現量の変化を定量する方法の 1 つである。(R.

Aebersold et al., Nature Biotech., 1999, 17, 994-999, WO 00/11208)
) I C A T 試薬を用いる方法ではタンパク質中のシステイン残基に注目し、ビオチンを含む特殊なアルキル化試薬によりシステインの S H 基をラベル化する。この方法は発現された広い量的な差異を持つ生体内タンパク質を定量することができ、タンデムマスと組み合わせて発現量が変化した発現タンパク質の同定も可能である。

【0003】

しかし、タンパク質中のシステイン含量が大きいと、上記の方法では最終的に得られるマスペクトルが複雑であることが予想される。また、ラベル化されたペプチドフラグメントを分離するためにアビジンカラムという特殊なカラムを必要とすることや、反応試薬の分子量が比較的大きい (600 程度) ため反応性が十分でないことも問題である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、反応性及び選択性に優れ、マスペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬に用いることができるスルフェニル化合物と、それを用いたラベル化試薬を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討した結果、同位体で標識された少なくとも 1 つの構成元素を有するスルフェニル化合物によって、上記目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち本発明は、一般式：



(式中、R は、同位体で標識された少なくとも 1 つの構成元素を有する有機基を表し、X は脱離基を表す。)

で表されるスルフェニル化合物である。

【0007】

本発明は、前記有機基Rは構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含み、前記同位体は、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である、前記のスルフェニル化合物である。

【0008】

本発明は、前記スルフェニル化合物の分子量が、前記化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12、好ましくは6～10大きい、前記のスルフェニル化合物である。

本発明は、前記同位体で標識された構成元素の数が3以上、例えば3～12、好ましくは6～10である、前記のスルフェニル化合物である。

【0009】

本発明は、前記有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又はアリール基である、前記のスルフェニル化合物である。

【0010】

本発明は、前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、前記のスルフェニル化合物である。

【0011】

本発明は、前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基からなる群から選ばれる、前記のスルフェニル化合物である。

本発明は、前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基である、前記のスルフェニル化合物である。

【0012】

本発明は、前記脱離基Xがハロゲン原子である、前記のスルフェニル化合物である。

【0013】

本発明は、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンス

ルフェニルクロリドからなる群から選ばれる、前記のスルフェニル化合物である。

【0014】

本発明は、前記のスルフェニル化合物を含むラベル化試薬である。

本発明は、タンパク質の解析の用途における、前記のラベル化試薬である。

【0015】

本発明は、前記スルフェニル化合物から選ばれた1つの化合物（以下、「重い試薬」と表記する。）と、前記選ばれた化合物と同一構造であり且つ前記同位体で標識されていない化合物（以下、「軽い試薬」と表記する。）とを、それぞれ別個に含む、前記のラベル化試薬である。

【0016】

本発明は、前記重い試薬が、前記軽い試薬との分子量の差が3～12、好ましくは6～10となるように設計された、前記のラベル化試薬である。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、式 $R-S-X$ (I)

（式中、Rは、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、Xは脱離基を表す。）

で表されるスルフェニル化合物である。このスルフェニル化合物は、同定すべき化合物のラベル化試薬として用いることができ、特に、タンパク質解析におけるラベル試薬として有用である。

【0018】

また、前記重い試薬と前記軽い試薬とをそれぞれ別個に含む2種の試薬を組み合わせたラベル化試薬を用いることにより、マスマスペクトルを応用したタンパク質の解析が容易になる。

なお、本明細書において、オリゴペプチドやポリペプチドなどの鎖状ペプチド及びタンパク質の立体構造を構成しているポリペプチドを「ペプチド」と総称し、「タンパク質」は前記「ペプチド」を含む意味として記載する。

【0019】

式(I)中有機基Rは、構成元素としてC、H、N、場合によりO及び／又はPを含む置換基である。また、前記同位体は安定同位体が好ましく、このようなものとしては、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O などが挙げられる。

【0020】

重い試薬と軽い試薬とを組み合わせることでペプチドのラベル化試薬として用いるとき、重い試薬によってラベル化されたペプチド及び軽い試薬によってラベル化されたペプチドを混合してマスマススペクトロメトリーによって測定する。この場合、前述の同位体の存在によって、それぞれのラベル化ペプチドのマス値に差が生じる。この差は、重い試薬の分子量と軽い試薬の分子量との差に相当する。

このとき、マス値の差は3～12マスが好ましく、6～10マスがより好ましい。マス値の差が3マス以上開くことにより、重い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドと、軽い試薬による化学修飾を受けたラベル化ペプチドとの双方のスペクトルピークが重なりにくくなるため、解析がしやすい。

【0021】

このことから、本発明のスルフェニル化合物の分子量は、その化合物と同一構造であり且つ同位体で標識されていない化合物の分子量よりも3～12大きいことが好ましく、6～10大きいことがより好ましい。従って、本発明のスルフェニル化合物が同位体として ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O などの質量数が1大きい同位体のみを含む場合、同位体で標識された構成元素の数は3以上、例えば3～12個が好ましく、6～10個がより好ましい。

一方、本発明のスルフェニル化合物が同位体として ^{18}O などの質量数が2大きい同位体を含む場合は、3以上のマス値の差を与えるために3個以上の同位体を必要としない場合もある。例えば、同位体として ^{18}O のみを含むスルフェニル化合物の場合、 ^{18}O で標識された構成元素が2個あれば、マスマススペクトルにおいて4マスの差が生じ、好ましいマス値の差を与えることができる。

【0022】

そして、これら本発明のスルフェニル化合物を重い試薬とし、軽い試薬とを組み合わせることでラベル化試薬として用いる場合は、重い試薬の分子量は、軽い試薬の分子量との差が3～12となるように設計されることが好ましく、6～10とな

るように設計されることがより好ましい。

【0023】

前記(I)式中の有機基Rは、置換されていても良いアルキル基又は置換されていても良いアリール基であることが好ましい。前記置換されていても良いアルキル基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

また、前記置換されていても良いアリール基が有する置換基は、 NO_2 基、 COOH 基、 SO_3H 基、 OH 基、アルキル基、アルコキシ基、アリール基、アリールオキシ基などが挙げられるが、これらに限定されない。

これら置換基は、当該試薬の反応性、溶解性などを調節するため適宜選択することができる。

また、前記有機基Rは、置換されていても良いフェニル基であることが好ましい。

【0024】

好ましく設定された有機基Rを有することにより、ラベル化試薬として用いた時に、逆相カラムなど通常のカラムにより容易にラベル化ペプチドの分離ができるようになる。

【0025】

前記(I)式中の脱離基Xとしては、F、Cl、Br、Iなどのハロゲン原子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0026】

本発明のスルフェニル化合物の分子量は、ラベル化すべきペプチドとの反応性を考慮して、190程度が好ましい。

【0027】

特に、本発明のスルフェニル化合物としては、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ジニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及び2-ニトロ-4-カルボキシ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドが好ましい。

【0028】

本発明のスルフェニル化合物は、対応するジスルフィド、チオール、スルフィドなどからハロゲン化などの方法により合成できる。例えば、有機基Rとして6個の ^{13}C で標識されたフェニル基を有するスルフェニル化合物を、例えばスルフィドから合成する方法として、以下に記述する方法が挙げられる。

【0029】

まず、前駆体のスルフィドは、例えばニトロ [$^{13}\text{C}_6$] クロロベンゼンなどの [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼン誘導体にベンジルメルカプタンを反応させることにより、 [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドとして得る。

次に、得られた [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドに、ハロゲン化剤を反応させ、目的とするスルフェニル化合物を得る。ハロゲン化剤としては、スルフリルクロリドや臭素などを用いると良い。溶媒としては、四塩化炭素、エチレンクロリドなどを用いると良い。反応条件としては、例えば $10^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ で5分～1時間かけて反応させる。

これらの諸条件は、当業者が適宜定めると良い。

【0030】

このようにして得られたスルフェニル化合物は、その化合物と同一構造であり且つ同位体標識されていない化合物とマスペクトルをそれぞれ比較することによりその同定を行うことができる。また、双方の ^{13}C 及び ^1H NMRをそれぞれ比較することによっても同定を行うことができる。

【0031】

本発明のスルフェニル化合物を用いることにより、同定すべき化合物に目印として標識置換基 (R-S-基) を導入することができるため、ラベル化試薬として用いることができる。

スルフェニル化合物は、ペプチド中に存在するトリプトファン残基のインドール環と選択的に反応することが知られているため、特に本発明の同位体で標識されたスルフェニル化合物は、タンパク質の解析におけるラベル化試薬として有用である。

【0032】

トリプトファンはタンパク質において、機能的にも活性面でも重要な役割を演じているアミノ酸である。トリプトファンを含むペプチドとしては、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、ガラニン（Galаниn）、副甲状腺ホルモン（PTH）、 α -キモトリプシン、グラミシジンA、リゾチームなどが挙げられる。

トリプトファンのタンパク質中含有量は、アミノ酸の中でも最も少ない部類に属するため、ラベル化反応及び酵素消化後のペプチドのマススペクトルが単純となり、その解析が容易となる。これはプロテオーム解析を行う上で大変有利である。

【0033】

スルフェニル化合物（同位体で標識された本発明のスルフェニル化合物及び従来の標識されていないスルフェニル化合物）は、トリプトファン残基が有するインドール環への求電子置換反応によって、トリプトファン残基をラベル化する。この反応は、ICAT法におけるシステイン残基とICAT試薬との求核置換反応よりも反応性が高いということが期待できる。

【0034】

スルフェニル化合物によるラベル化によって生成したラベル化トリプトファン残基含有ペプチドは、ラベル化前のトリプトファン残基含有ペプチドよりも疎水性が高いため、ICAT法で用いるような特殊なカラムを使用することなくその分離・精製を行うことができる。たとえば、ゲル濾過や逆相カラムなどで十分分離・精製が可能である。

【0035】

本発明のラベル化試薬は、重い試薬と軽い試薬とを組み合わせたものとして用いると、例えば次のようにしてタンパク質の解析を行うことができる。

タンパク質構成の違う2種のサンプル（例えば、正常細胞に由来するタンパク質と病細胞に由来するタンパク質）を用い、一方を重い試薬で、他方を軽い試薬でラベル化する。ラベル化反応は、通常の方法を用いて行う。別々にラベル化したそれぞれのサンプルは、その後は混合し、必要に応じて酵素消化等一連のプロセスを経て、マススペクトロメトリーにより測定を行う。

【0036】

通常のマススペクトル (MS) では、軽い試薬の分子量と重い試薬の分子量との差に相当するマス差をもつ一組のピークを見つけることにより、それぞれのサンプル中に共通して存在するペプチドのモル比を知ることができる。タンデムマススペクトル (MS/MS) と組み合わせると、ペプチドの同定をすることができる。

【0037】

【実施例】

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0038】

【実施例1】

本実施例では、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を、対応するスルフィドから合成した。

(スルフィドの合成)

1 g ($6.1 \times 10^{-3} \text{mol}$) の2-ニトロクロロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンを1 ml のメタノールに溶解し、ここに0.8 g ($6.6 \times 10^{-3} \text{mol}$) のベンジルメルカプタン、0.8 ml (0.01 mol) のピリジンを加え、16時間加熱還流した。室温に放冷し2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィドを析出させ、この結晶を濾別し、メタノールで洗浄した。風乾後黄色結晶として2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィド1.38 g (90%) が得られた。

【0039】

(重い試薬の合成)

前述のようにして得られた2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] フェニルベンジルスルフィド1.38 g ($5.5 \times 10^{-3} \text{mol}$) にエチレンクロリド10 ml を加え、さらにスルフリルクロリド940 mg ($7.9 \times 10^{-3} \text{mol}$) を加え、室温で攪拌した。反応溶液を湯浴で50~60℃に加温しながら減圧濃縮した。得られた油状物に石油エーテルを加え、生じた結晶を濾別した。結晶を石油エーテルで洗浄し風乾して2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドを938 mg (

87%)を得た。

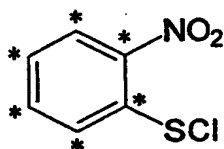
【0040】

(同定)

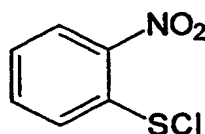
得られた重い試薬と、対応する軽い試薬(2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド)とをそれぞれマススペクトロメトリーにより測定した。重い試薬と軽い試薬の構造式を化1に示す。式中、*は、 ^{13}C で標識された炭素原子を表す。

【0041】

【化1】



重い試薬



軽い試薬

【0042】

・重い試薬

(m/z) 195.10(M^+ , 34.1), 160.10(15.2), 144.10(4.7), 131.10(25.0), 114.10(15.6), 99.20(100.0), 83.10(10.6), 71.20(32.3), 54.20(12.3)

・軽い試薬

(m/z) 189.00(M^+ , 35.3), 154.10(15.8), 138.10(4.9), 125.10(26.3), 108.10(17.6), 93.10(100.0), 78.10(14.1), 66.10(32.2), 50.20(15.3)

重い試薬と軽い試薬とのマススペクトルを比較すると、分子イオン及びベンゼン環を有するフラグメントイオンは全て6マスの差があり、それぞれのフラグメントピークの強度は全て同程度であった。

【0043】

〔予備実験〕

モデルペプチドとしてACTH及びGaladin、ラベル化試薬として2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド(軽い試薬)を用い、ラベル化されたペプチドとラベル化されていないペプチドとが分離されるかどうかの予備

実験を行った。

【0044】

ACTH160 μg ($5.4 \times 10^{-8} \text{mol}$) を70%酢酸水溶液100 μl に溶解した。ここに2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド0.41 mg (40 mol) を加え、室温下1時間ボルテックスミキサーにより攪拌した。反応溶液を氷冷後、氷冷したエーテル800 μl を加え、遠心分離した。沈殿を氷冷したエーテルで洗浄し、ラベル化体を得た。ラベル化したペプチドと、ラベル化に供しなかったペプチドとをそれぞれ混合し、逆相カラム (LC) による分離を行った。Galanimについても同様にして分離を行い、それぞれの保持時間を以下に示した。(ラベル化したペプチドは、mod-を用いて表した。) なお、簡略された系であるため、酵素消化は行わなかった。

【0045】

(保持時間)

ACTH	16.57分
mod-ACTH	34.78分
Galanim	21.78分
mod-Galanim	35.27分

【0046】

(条件)

A buffer: 0.01M $\text{HCOOH-Et}_3\text{N}$ (pH 4.5)

B buffer: 0.01M $\text{HCOOH-Et}_3\text{N}$ (pH 4.5) in CH_3CN

Bの勾配: 0%~100%を50分かけて流した。

カラム: Shimpack VP-ODS、250*4.5mm

【0047】

表1に示すように、ラベル化されたものとそうでないものとは、2種双方とも14分~18分の保持時間の差が生じたため、LCによってラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

また、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (重い試薬) を用いて同様の分離実験を行ったところ、保持時間はほぼ同一であったため、重い試

薬でもラベル化ペプチドのみを分離できることが分かった。

【0048】

〔実施例2〕

本実施例では、「重い試薬」として2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、「軽い試薬」として2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドを用いた。

【0049】

まず、サンプルペプチドとしてACTH、Galaninを用い、2つの異なる状態の細胞をこれらのペプチドの含有比率を次のように設定することでモデル化した。

- ・セルA ACTH:Galanin=1:1 (モル比)
- ・セルB ACTH:Galanin=1:2 (モル比)
- ・セルAとセルBのペプチド含有モル比 セルA:セルB=2:3

次に、これら各々の系について、セルAについては「軽い試薬」を用い、セルBについては「重い試薬」を用い、実施例2と同様の方法で別々にラベル化反応を行った。これらの系は簡略化されたものであるため、酵素消化などは行わなかった。

ラベル化反応後、これら2つの系を混合し、セファデックスG25を用いてゲル濾過した。

【0050】

ゲル濾過したペプチドを、LCを用いてラベル化ペプチドのみを分離した。このようにして得られたラベル化ペプチドを、MALDI TOFMSによって測定した。得られたマスペクトルを図1及び図2（図1の続き）に示した。

【0051】

マスペクトルの結果より、ピーク強度比から、設定したペプチド含有率が正確に反映された。「軽い試薬」によって修飾を受けたペプチドをL-mod、「重い試薬」によって修飾を受けたペプチドをH-modと表した。

・分子イオン(m/z)

3086.60 [ACTH(L-mod)]、3092.64 [ACTH(H-mod)]、3316.68 [Gal

anin(L-mod)]、3322.68 [Gal anin(H-mod)]

・ピーク強度比

ACTH(L-mod) : ACTH(H-mod) = 1 : 1

Gal anin(L-mod) : Gal anin(H-mod) = 1 : 2

【0052】

PTHについて、予備実験と同様のLCカラム条件で実験を行ったところ、保持時間はそれぞれ、ラベル化されていないPTHは24.78分、ラベル化されたPTHは35.47分であり、ラベル化ペプチドが分離できることが分かった。このことから、PTHに対しても本発明のラベル化試薬が適用できることが確認できた。

【0053】

【発明の効果】

本発明によれば、反応性及び選択性に優れ、マススペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬に用いることができるスルフェニル化合物と、それを用いたラベル化試薬を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

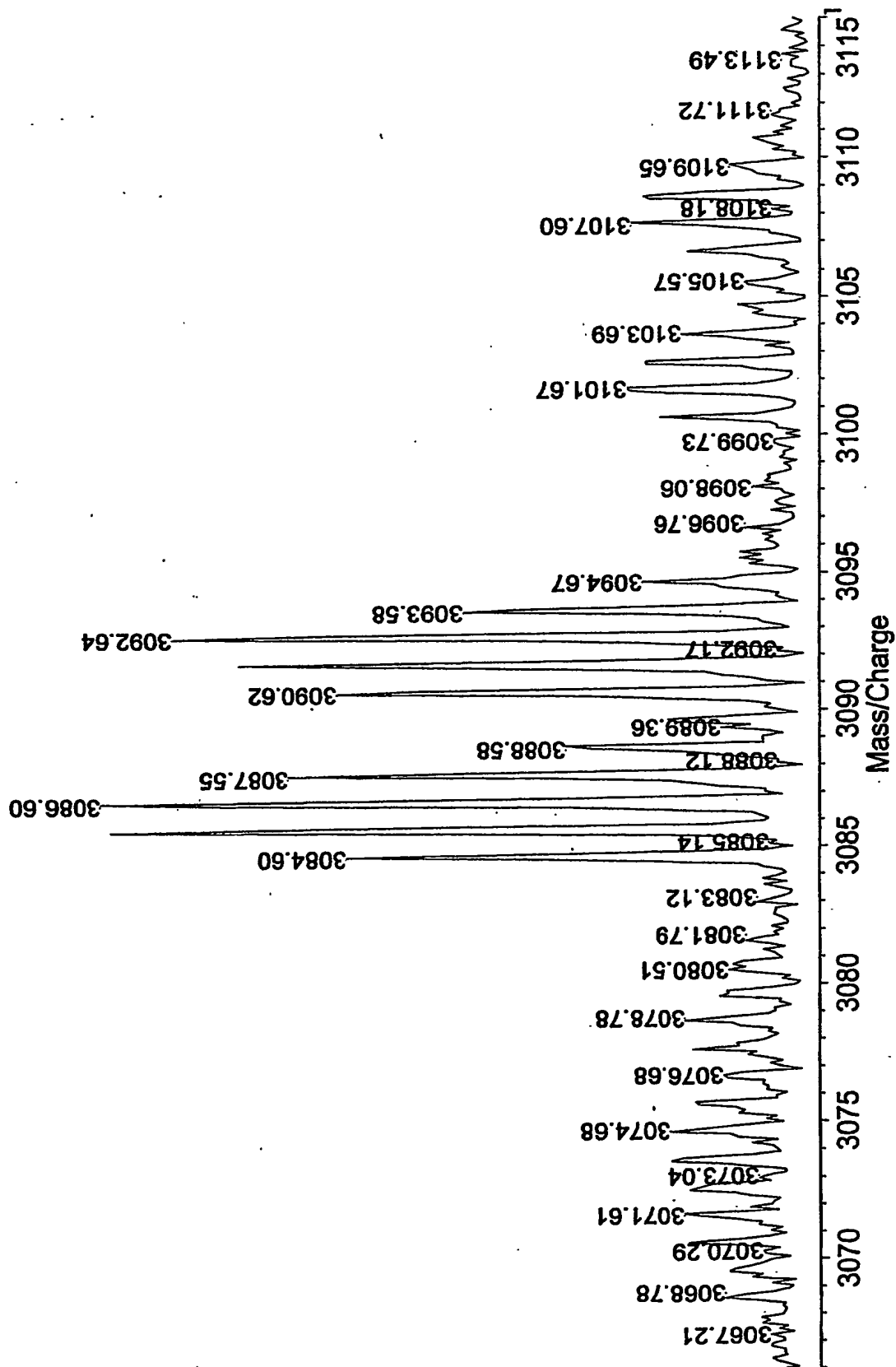
【図1】 実施例2のラベル化ペプチドを、MALDI TOFMSによって測定したスペクトルチャートである。

【図2】 図1のチャートの続きである。

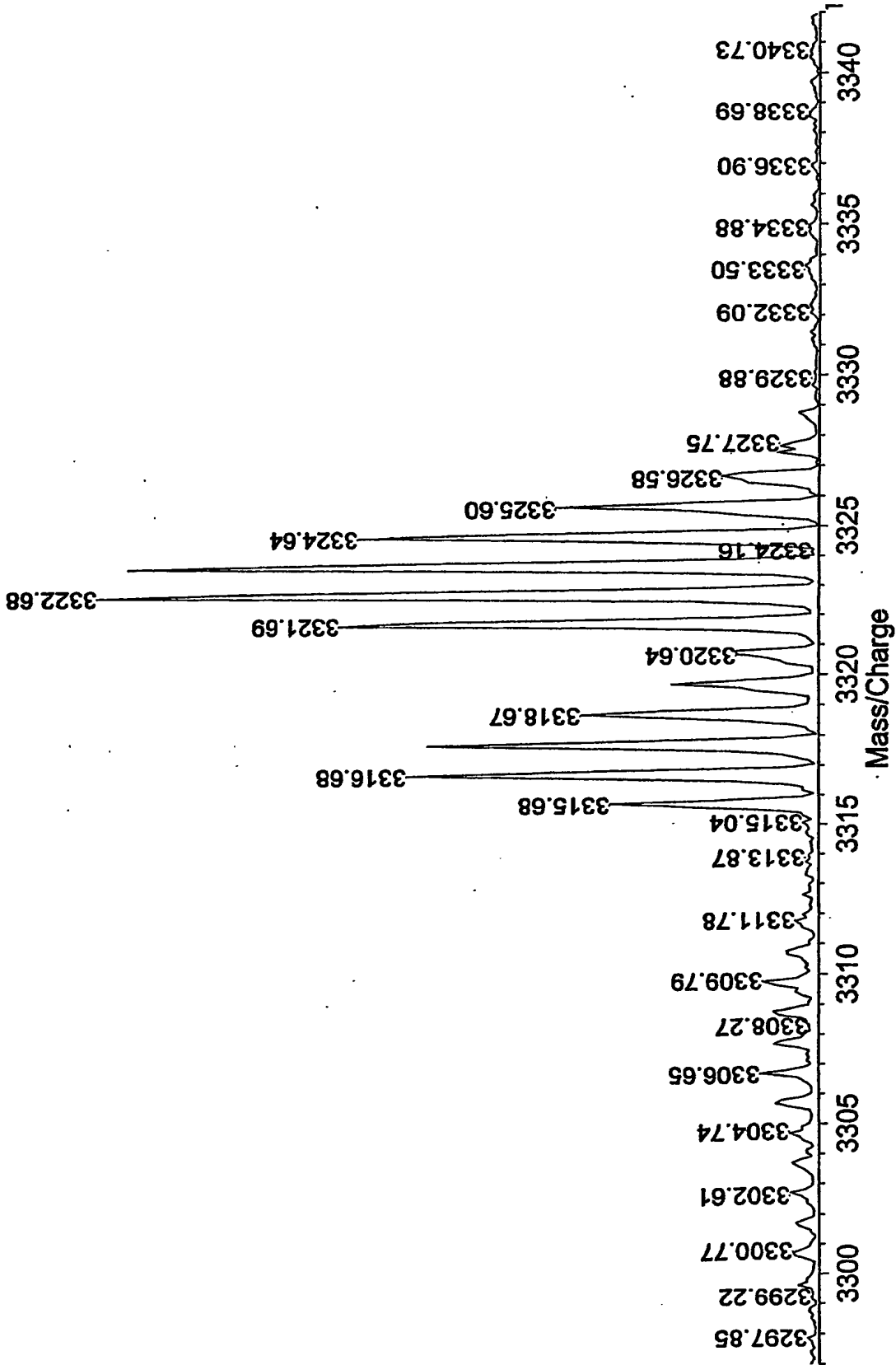
特 2 0 0 2 - 1 9 1 4 9 7

【書類名】

図面



【 1 図 】



【図2】

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 反応性及び選択性に優れ、マススペクトルでの解析が容易で定量性も高く、かつ特殊なカラムを必要としないラベル化試薬に用いることができるスルフェニル化合物と、それを用いたラベル化試薬を提供する。

【解決手段】 一般式 $R-S-X$ （式中、 R は、同位体で標識された少なくとも1つの構成元素を有する有機基を表し、 X は脱離基を表す。）で表されるスルフェニル化合物。好ましくは、前記有機基 R は構成元素として C 、 H 、 N 、場合により O 及び／又は P を含み、前記同位体は、 2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体である。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001993]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

氏 名 株式会社島津製作所